L-氨基酸脱氨酶的分子改造及其用于全细胞催化法生产α-酮戊二酸条件的优化*

王越　李江华　堵国成　刘龙**

（江南大学　生物工程学院　江苏省　无锡市　214122）

摘要　α-酮戊二酸（α-ketoglutaric acid, α-KG）是谷氨酸脱氨基的酮酸产物，作为一种重要的有机酸广泛用于食品、医药、精细化工等领域。为提高 L-氨基酸脱氨酶全细胞催化法合成α-KG 的效率及产量，首先通过优化全细胞催化剂制备条件及全细胞转化反应条件，包括发酵过程中的温度、pH、诱导剂浓度，诱导剂添加时刻、诱导时间等；全细胞转化过程中的温度、pH、细胞量、转化时间。各个条件优化后以 200 g·L^{-1} 谷氨酸钠为底物时，产量最终提高了 54.9 %，摩尔转化率为 39.6 %。其次，通过定点饱和突变对 L-氨基酸脱氨酶进行定向进化以提高其催化能力。经过多次突变、筛选，最优突变体 *E.coli* BL21-pET-20b(+)-*pm1*152 催化 200 g·L^{-1} 谷氨酸钠生成α-KG 最高产量为 100.9 g·L^{-1}，摩尔转化率为 64.7 %，较最初对照菌株提高了 66.3 %。结果表明，条件优化和饱和突变可有效提高重组大肠杆菌全细胞转化合成α-KG 的能力。

关键词　L-氨基酸脱氨酶　条件优化　定点饱和突变　全细胞催化

中图分类号　Q819

国家自然科学基金优秀青年基金(31622001)、江苏省重点研发计划-社会发展(BE2016638)

**通讯作者：刘龙，电子信箱：longliu@jiangnan.edu.cn

α-酮戊二酸（α-KG）是一种重要的有机酸，也是连接碳-氮代谢的关键节点，在食品、医药、精细化工等领域有广泛应用[1-3]。目前，α-酮戊二酸主要通过化学合成法和发酵法生产，其中化学合成存在使用有毒物质，收率低等问题[4]，发酵法存在副产物过多，发酵周期长等弊端[5]，制约了其应用和工业化生产。在之前的研究中，我们已使用生物转化法合成酮戊二酸、酮异己酸、苯丙氨酸和酮异戊酸等多种酮酸[6-10]。全细胞转化法拥有多种优势：能为酶反应提供稳定环境、产物单一易分离等[11]。L-氨基酸脱氨酶(PM1)作为一种膜蛋白，以非共价结合的黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）作为辅因子，催化 L-氨基酸氧化脱氨基生成相应的α-酮酸和氨[12-14]。在之前的工作中，我们研究室已构建好表达 *pm1* 的大肠杆菌，其能催化 L-谷氨酸生成α-酮戊二酸[15]。本研究中通过两种策略提高以谷氨酸钠（MSG）为底物转化生成产物α-酮戊二酸（α-KG）的生成量。一是全细胞催化剂制备及生物转化条件优化提高产物合成量，二是通过饱和突变技术对 PM1 进行定向进化以提高酶的催化能力。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

1.1.1　试剂　Prime STAR HS DNA polymerase，2×Taq PCR mix，细菌感受态制备试剂盒、Blunting Kination Ligation（BKL）Kit 6127A 购自 TAKARA 公司（大连，中国）。Gene JET PCR 试剂盒买自 Thermo 公司 San Prep 柱式质粒小量抽提盒、IPTG 和氨苄青霉素购买于上海生工，α-KG 标准样品买自 Sigma-Aldrich 公司。

1.1.2　菌种　*Escherichia coli* BL21(DE3)-pET-20b(+)-*pm1*，构建于本研究室，其为过表达 *pm1* 基因的重组大肠杆菌 BL21(DE3)，表达载体为 pET-20b(+)。

1.1.3　培养基　种子培养基为液体 LB：1 L 水中包含 10 g NaCl，5 g 酵母粉，10 g 蛋白胨。发酵培养基为 TB：1 L 水中包含 5 g 丙三醇，24 g 酵母粉，12 g 蛋白胨，2.31 g 磷酸二氢钾，16.37 g 三水合磷酸氢二钾。LB 固体培养基：1 L 水中包含 10 g NaCl，5 g 酵母粉，10 g 蛋白胨，20 g 琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化及培养　-80℃保存的 *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET-20b(+)-*pm1* 甘油管划线于含有氨苄青霉素的固体 LB 培养基上，37℃，过夜培养。挑取单菌落于 LB 液体培养基中，37℃，220 r·min^{-1} 培养，按 2 %转接于 TB 培养基，当菌液 OD_{600} 值合适时加入一定浓度的 IPTG，进行诱导培养。

1.2.2 全细胞催化剂制备　重组大肠杆菌摇瓶培养后，4 ℃，5095×*g* 离心 10 min 收集菌体，缓冲液洗涤菌体两次，重悬于缓冲液中，调节菌浓 OD_{600} 至 80~100 后 4 ℃保存备用。细胞量 DCW(g·L^{-1}）和 OD_{600} 值换算公式(1)如下：

$$DCW(g\cdot L^{-1}) = 0.4442 \times OD600 - 0.021$$ [15] (1)

1.2.3 发酵过程诱导温度优化　以 15℃、20℃、25℃、30℃为温度梯度，将培养的种子以体积分数 2 %接种到 50 ml 的发酵培养基中。37 ℃条件下培养，直至菌体 OD_{600} 增长到 2.0 时添加 0.04 mmol·L^{-1} 的 IPTG 诱导。12 h 后，取等量的细胞量，测定 30 ℃下全细胞转化 200 g·L^{-1} 底物 MSG 生成产物α-KG 的生成量。

1.2.4 发酵过程诱导剂添加时刻优化　按每隔 30 min 向 TB 培养基中转接种子液的方式，在 37 ℃下培养菌体，不同培养时间下可以得到不同 OD_{600} 值的发酵液。从一系列发酵液中挑取 OD_{600} 值约为 2.0、3.0、4.0、5.0 的菌液，同时向其分别添加 0.04 mmol·L^{-1} 的 IPTG，在 20 ℃下诱导 12 h 后，取等量的细胞量，测定 30 ℃下全细胞转化 200 g·L^{-1} 底物 MSG 时产物α-KG 的生成量。

1.2.5 发酵过程诱导时间、诱导剂浓度优化　将培养的种子以体积分数 2 %接种到 50 ml 的发酵培养基中，在 37 ℃条件下培养，直至菌体 OD_{600} 增长到 3.0 时添加 0.04 mmol·L^{-1} 的 IPTG 诱导。在 20 ℃下，分别诱导 8 h、12 h、16 h 后，取等量的细胞量，测定 30 ℃下全细胞转化 200 g·L^{-1} 底物生成产物的生成量。设置 IPTG 浓度 0.01 mmol·L^{-1}、0.02 mmol·L^{-1}、0.04 mmol·L^{-1}、0.06 mmol·L^{-1}、0.1 mmol·L^{-1}、0.2 mmol·L^{-1}、0.4 mmol·L^{-1}、0.8 mmol·L^{-1} 这 8 个梯度。将培养的种子以体积分数 2 %接种到 50 ml 的发酵培养基中，在 37 ℃条件下培养，直至菌体 OD_{600} 增长到 3.0 时添加不同浓度的 IPTG。在 20 ℃下诱导 12 h，取等量的细胞量，测定 30 ℃下全细胞转化 200 g·L^{-1} 底物生成产物α-KG 的生成量。

1.2.6 种子液培养时间优化　对重组大肠杆菌种子液培养时间设置 8 h、10 h、12 h 这 3 个梯度。均将培养的种子以体积分数 2 %接种到 50 ml 的发酵培养基中，在 37 ℃条件下培养，直至菌体 OD_{600} 增长到 3.0 时添加 0.04 mmol·L^{-1} 的 IPTG。在 20 ℃下诱导 12 h，取等量的细胞量，测定 30 ℃下全细胞转化 200 g·L^{-1} 底物生成产物的量。

1.2.7 催化反应温度、pH 优化　对转化温度设置 25℃、30℃、35℃、40℃这 4 个梯度，细胞量（DCW）设置为 20 g·L^{-1}，测定不同温度下全细胞转化 200 g·L^{-1} 底物生成产物的量。对全细胞转化反应 pH 设置 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 这 8 个梯度，DCW 为 20 g·L^{-1}，测定 30 ℃下全细胞转化 200 g·L^{-1} 底物生成产物α-KG 的生成量。

1.2.8 催化反应时间、细胞量优化　取等量的细胞量，测定 30 ℃，不同转化时间下全细胞转化 200 g·L^{-1} 底物生成产物的量。对细胞量设置由 5 g·L^{-1} 开始以 5 g·L^{-1} 为增量直至 40 g·L^{-1} 8 个梯度，测定 30 ℃下全细胞转化 200 g·L^{-1} 底物生成产物α-KG 的生成量。

1.2.9 L-氨基酸脱氨酶结构模型构建及底物对接　从 Swiss Model 在线网站获得 PM1 同源性为 93.74 % 的晶体模型，该晶体模型来源于 *Proteus myxofaciens*，序列号为 5FJM[16]。同源建模后使用自动对接软件 AutoDdck 4.0 对蛋白模型和 L-谷氨酸进行分子对接。通过分析模型活性中心关键位点及底物与 FAD 和酶的作用，选取 I100、G206、G199、G235、P272、V276、V283、E340、L363、N406 共 10 个氨基酸进行单点随机突变。

1.2.10 L-氨基酸脱氨酶定点饱和突变及筛选　通过软件结果分析确定要突变的氨基酸位置后，设计突变引物，将氨基酸的密码子进行随机替换，构建突变库。突变建库方法为全质粒扩增后进行磷酸化，使用 Blunting Kination Ligation（BKL）Kit 法进行连接，本研究中用于定点饱和突变的引物名称及序列如表 1 所示。高通量筛选：在以上构建的突变库中随机挑取 100 个单克隆到 96 孔板中，37℃培养 10 h。按 50 %的接种量转接到 48 孔板中，同时添加终浓度为 0.04 mmol·L^{-1} 的 IPTG，于 37 ℃进行诱导培养，4 h 后离心(4200×*g*，5 min，4 ℃)，弃上清。底物 MSG 浓度 50 g·L^{-1} 溶解于 0.2 M 的 Tris-Hcl(pH 为 8.0)缓冲液中。将 600 μl 底物添加到含有细胞的 48 孔板中进行催化反应，37 ℃，1 h 后离心停止反

应，通过显色法测量上清液中产物α-KG 含量。显色测量方法为：取 50 μl 上清液与 100 μl 0.1% 2,4-二硝基苯肼混合，室温放置 5 min 后加入 1 ml 1.5 M 氢氧化钠溶液，待颜色稳定后吸取 200 μl 液体于 96 浅孔板中，酶标仪检测其在 520 nm 下的吸收值。通过高通量筛选将获得的产量提高的突变体进行摇瓶复筛，以确定酶催化效率提高的突变体。

表 1 定点饱和突变引物

Table 1 Primer for site-saturation mutagenesis

引物名称	碱基序列（5'-3'）
I100-F	NNNATTAGTTACCAAACATCACCAGAAATCTTCCC
I100-R	TTGGCTGTATGCACGGCCTGATTG
G206-F	NNNACACCTGCACTCGCTCGTTATG
G206-R	TGTTTCAGGATCAACAGAGCCTGAAT
G235-F	NNNAAAATCTCTGATGTGGTGAGTGAG
G235-R	ACCCGCAGTTTCAATACCTCTTAC
P272-F	NNNACGCTCAATGTATATCTATCACAACAACGT
P272-R	GATATCAATACCCATATTGCCCATAAATAAACGTGAC
V276-F	NNNTATCTATCACAACAACGTGTCTCAGGG
V276-R	ATTGAGCGTTGGGATATCAATACCCATATTGC
L278-F	NNNTCACAACAACGTGTCTCAGGG
L278-R	ATATACATTGAGCGTTGGGATATCAATACCC
V283-F	NNNTCAGGGGTTCCTGGTGCACCAC
V283-R	ACGTTGTTGTGATAGATATACATTGAGCGTTG
E340-F	NNNTTACCGTTGGAATTCTCTATTGGTG
E340-R	TCCGCCACCTAATAAGTGCATAAATTTAGG
L363-F	NNNGATGAAAAAACACCATTCGAACAATTCCG
L363-R	ATTCCAAGAGGTCGGCATTTTAAATG
N416-F	NNNGAATTACCTATCATTTCTGAGGTCAAAGAATAC
N416-R	AAATGTTGGACTCACAACGGCACCCCAAC

注：突变位点已用下划线标注

Note: The mutation site has been underlined

1.2.12 α-酮戊二酸含量分析方法　采用高效液相色谱法(HPLC)测量α-酮戊二酸的产量。取反应液 50 μl 稀释一定倍数后离心，上清用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤，滤液即为待测样品。液相检测条件为：Agilent 1260 型高效液相色谱仪，柱温为 40℃，进样量为 10 μ1，流动相为 5mmo1·L^{-1} 稀 H_2SO_4，紫外检测波长为 210 nm，流速为 0.6 ml·min^{-1}，进样时间为 15 min，伯乐 Aminex HPX-87H 色谱柱(300 x 7.8 mm,　9 μm)。

2 结果与讨论

2.1 全细胞催化剂制备条件优化

2.1.1 最适诱导温度　以 15 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃四个不同诱导温度，在 OD_{600}=2.0 时添加终浓度 0.04 mmol·L^{-1} 的 IPTG 诱导。12 h 后对培养得到的菌体进行全细胞催化转化底物 MSG 实验，MSG 总浓度 200 g·L^{-1}，对产物α-KG 的生成量进行了研究。结果如图 1 所示，表明：最适诱导温度为 20 ℃，此时产量最高，为 37.4 g·L^{-1}，摩尔转化率为 23.9 %。

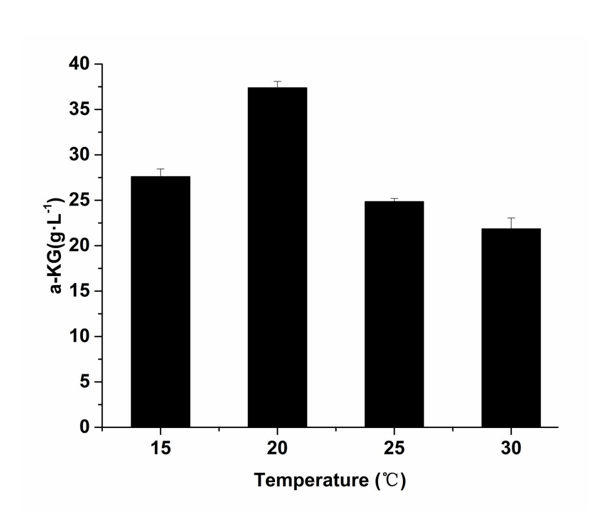


图 1 诱导温度优化

Fig. 1 The optimization of induction temperature

2.1.2 最适诱导剂添加时刻 向不同 OD_{600} 值菌液中添加终浓度为 0.04 mmol·L^{-1} 的 IPTG 进行诱导。诱导温度 20 ℃，12 h 后对获得的菌体进行全细胞转化 MSG 实验，MSG 总浓度 200 g·L^{-1}，比较产物α-KG 的生成量，结果如图 2 所示。当向 OD_{600} 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0 的菌液中添加 IPTG 时，OD_{600}≈2.0 时产量最高，为 42.3 g·L^{-1}，摩尔转化率为 27.1 %。但当 OD_{600} 为 2.0 时诱导，诱导结束时 OD_{600} 值较低（如图 2 所示）。相同条件下不利于进行后续实验，而 OD_{600} 为 3.0 时诱导，诱导结束时 OD_{600} 值较高，且产物生成量为 41.4 g·L^{-1} 与最高值相差不大。故 OD_{600} 为 3.0 时诱导效果最好，产量为 41.4 g·L^{-1}，摩尔转化率为 26.5 %。

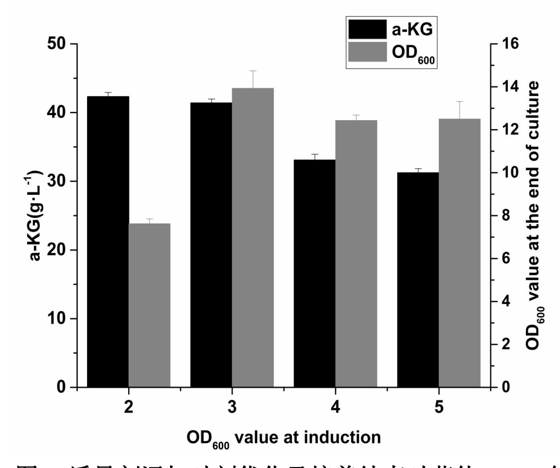


图 2 诱导剂添加时刻优化及培养结束时菌体 OD_{600} 值

Fig. 2 The optimization of expression cell age and the OD_{600} value at the end of culture

2.1.3 最适诱导时间及诱导剂浓度 在 20 ℃诱导条件下，菌液 OD_{600}≈3.0 时添加终浓度为 0.04 mmol·L^{-1} 的 IPTG。分别在 8 h、12 h、16 h 后对获得的菌体进行全细胞转化 MSG 实验，MSG 总浓度 200 g·L^{-1}，比较产物α-KG 的生成量，结果如图 3 所示。可知，在诱导 12 h 后产量达到最高，为 43.0 g·L^{-1}，摩尔转化率为 27.5 %。诱导时间过长对产物生成产生负影响。

在菌液 OD_{600} 为 3.0 时添加不同浓度的 IPTG 诱导剂，20 ℃诱导条件下，诱导 12 h。获得的菌体进行全细胞转化 MSG 实验，MSG 总浓度 200 g·L^{-1}，比较产物α-KG 的生成量，结果如图 4 所示。可知，产物随诱导剂浓度的增加先增加后减少，在诱导剂 IPTG=0.06 mmol·L^{-1} 时产量最高，为 45.1 g·L^{-1}，摩尔转化率为 28.9 %。由于诱导剂 IPTG=0.06 mmol·L^{-1} 培养 12 h 后细胞量（OD_{600}）明显低于 IPTG=0.04 mmol·L^{-1} 诱导培养细胞量（OD_{600}）（如图 4 所示），且二者产量相差不大，故此后的实验仍采用 IPTG=0.04 mmol·L^{-1} 诱导。

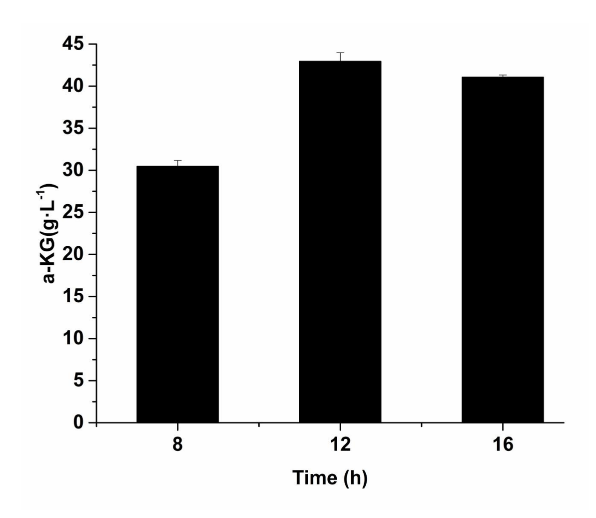


图 3 诱导时间优化

Fig. 3 The optimization of induction time

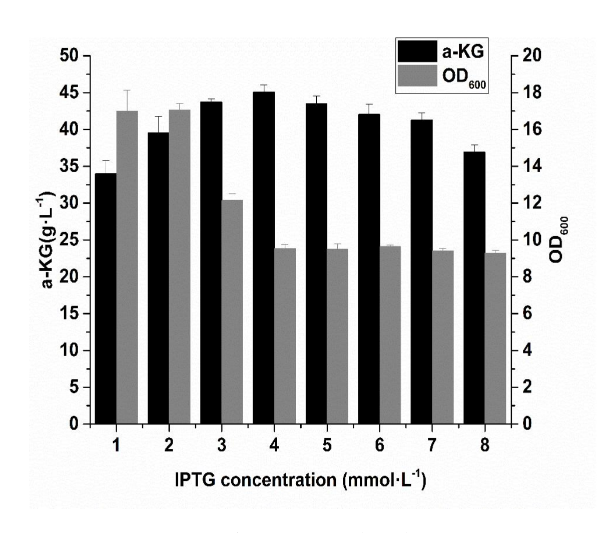


图 4 IPTG 浓度优化及培养结束时菌体 OD_{600} 值

Fig. 4 The optimization of IPTG concentration (a) and the OD_{600} value at the end of culture

2.1.4 最适种子液培养时间　根据菌体生长曲线，将培养不同时间的种子液转接 TB 培养基进行诱导培养。所得菌体进行全细胞转化 MSG 实验，比较其产物生成量，结果如图 5 所示。结果表明使用培养 10 h 的种子液转接诱导培养时，所得全细胞催化剂转化产量最高，为 42.2 g·L^{-1}，摩尔转化率为 27.0 %。

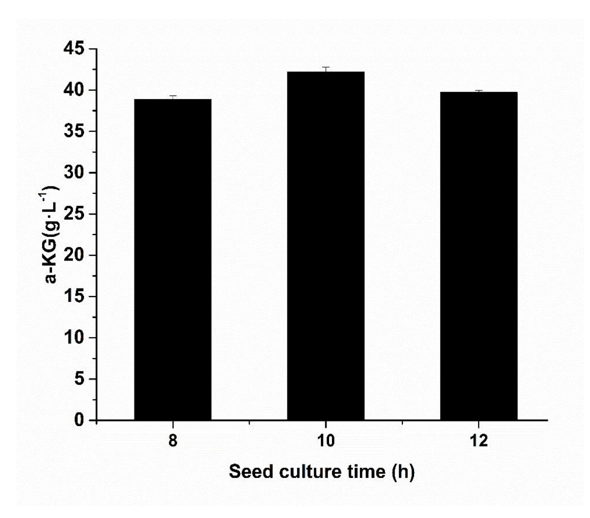


图 5 种龄对催化合成α-酮戊二酸的影响

Fig. 5 Effects of seed culture time on alpha-ketoglutarate production

根据以上结果显示，发酵过程的最适条件为：种子培养 10 h，诱导剂浓度 0.06 mmol·L^{-1}，菌体 OD_{600} 值为 3.0 左右时添加诱导剂最合适，最适诱导温度为 20℃，诱导时间 12 h。

2.2 全细胞转化反应条件优化

2.2.1 最适反应温度及 pH　设置 25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃四个温度梯度。在 pH 8.0 的 Tris-Hcl 缓冲液中，添加 200 g·L^{-1} 的 MSG 为底物和 DCW 为 20 g·L^{-1} 的细胞进行全细胞转化反应。48 h 后测定不同反应温度下产物α-KG，如图 6 所示，可知，在 30 ℃下产物α-KG 的生成量最高，为 42.0 g·L^{-1}，摩尔转化率为 26.7 %。

配制 pH 5.5- 8.0 的磷酸缓冲液及 pH 7.5- 9.0 的 Tris-Hcl 缓冲液。在 30 ℃，以 200 g·L^{-1} 的 MSG 为底物，20 g·L^{-1}（DCW）细胞量进行全细胞转化反应，48 h 后测定不同 pH 下产物α-酮戊二酸的生成量，如图 7 所示。可知，在 pH 6.0 的磷酸缓冲液中产物α-KG 生成量最高，为 54.9 g·L^{-1}，摩尔转化率为 35.2 %。在 pH 高于 6.0 或低于 6.0 时，催化反应产量减少可能是由于 pH 过高或过低使酶的活性中心结构发生了变化，使底物与酶结合效率降低。在相同 pH 条件下的磷酸缓冲液效果优于 Tris-Hcl 缓冲液，这说明磷酸缓冲液更利于 L-氨基酸脱氨酶 PM1 转化底物 MSG 生成产物α-KG。

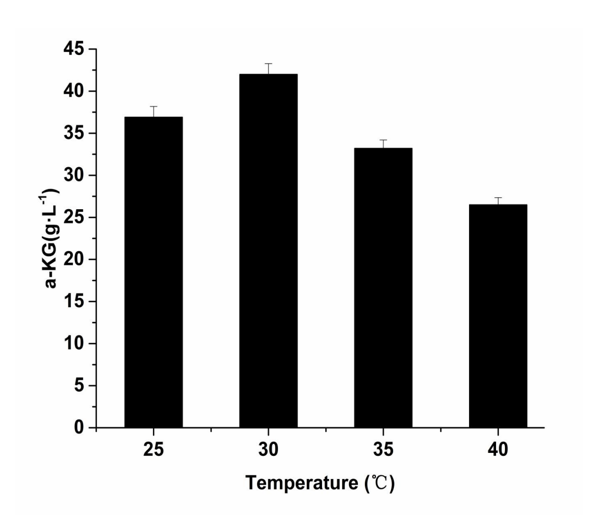


图 6 温度对催化合成α-酮戊二酸的影响

Fig. 6 Effects of temperature on alpha-ketoglutarate production

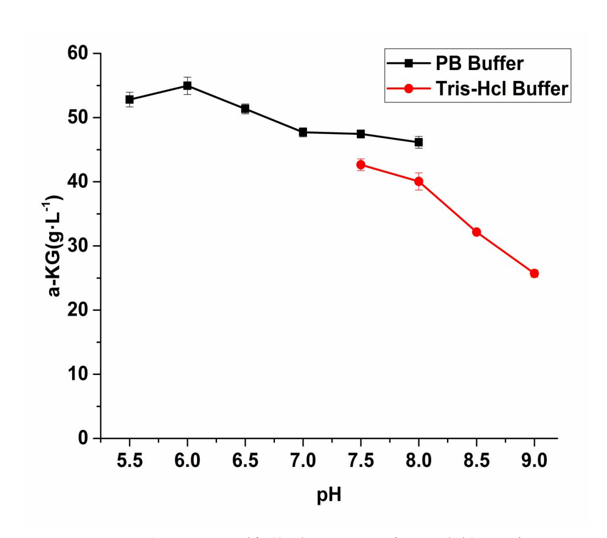


图 7 pH 对催化合成α-酮戊二酸的影响

Fig. 7 Effects of pH on alpha-ketoglutarate production

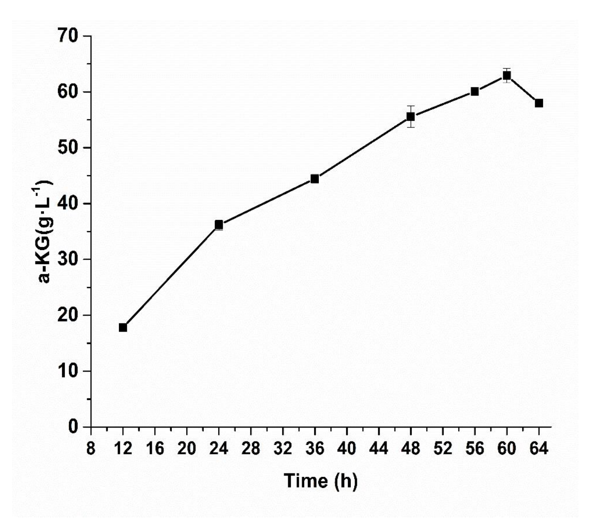


图 8 转化时间对催化合成α-酮戊二酸的影响

Fig. 8 Effects of biocatalytic time on alpha-ketoglutarate production

2.2.2 最适反应时间及细胞量 在 pH 6.0 的磷酸缓冲液中，30 ℃，细胞浓度（DCW）20 g·L-1，底物 MSG 200 g·L-1 的条件下进行全细胞转化反应 64 h。测定产物α-KG 产量最高，为 61.9 g·L-1，摩尔转化率为 39.6 %。延长转化时间，产量降低，可能原因是随着产物生成，转化液中底物浓度降低，细胞转化生成产物速率下降，小于细胞自身消耗产物速率，从而导致α-KG 产量下降[15]。

对细胞量(DCW)在 5 g·L-1-50 g·L-1 范围内设置不同梯度。以 200 g·L-1 的 MSG 为底物，在 pH 6.0 的磷酸缓冲液中，30 ℃下进行全细胞转化，60 h 后测定不同细胞浓度下产物α-KG 的生成量。结果如图 9 所示，当细胞浓度（DCW）为 20 g·L-11 时产量最高，为 61.8 g·L-1，摩尔转化率为 39.6 %。此外，在细胞量（DCW）大于 20 g·L-1 的四个梯度条件下，全细胞转化产量下降。可能原因是细胞浓度的增加导致转化液中α-KG 浓度迅速加大，而且细胞浓度较高，使得溶氧速率变慢，同时脱氨酶催化 MSG 产生α-KG 是耗氧过程[17]，因此对α-KG 产量产生负向影响。

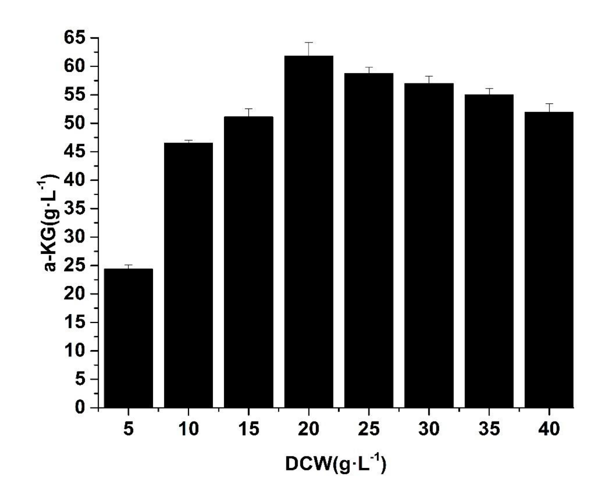


图 9 细胞量对催化合成α-酮戊二酸的影响

Fig. 9 Effects of DCW on alpha-ketoglutarate production

综上所述，全细胞转化最适反应温度为 30 ℃，最适反应 pH 为 6.0，最适反应时间 60 h，最适反应细胞浓度(DCW)为 20 g·L-1。

2.3 L-氨基酸脱氨酶结构模型构建及底物对接

采用 AutoDock 4.0 软件进行 L-氨基酸脱氨酶分子结构与 L-谷氨酸对接。根据晶体模型 5FJM[16]找出对应的 FAD 活性位点，结果如图 10-(a)(b)所示。选取 FAD 活性位点及底物结合口袋附近氨基酸(图 10-(c))进行定点饱和突变。底物与酶作用如图 10-(d)所示。

图 10 L-氨基酸脱氨酶与 L-谷氨酸对接结果

(a)：L-谷氨酸的对接位置 (b)：FAD 活性位点 (c)：突变位点选取 (d)：蛋白与底物的作用位置

Fig. 10 The docking result of L-amino acid deaminase and L-glutamic acid

(a): The docking position between L-glutamic acid and L-amino acid deaminase (b): FAD active site

(c): Mutation site selection (d): L-amino acid desminase and L-glutamic acid action position

2.4 L-氨基酸脱氨酶定点饱和突变

对 I100、G206、G199、G235、P272、V276、V283、E340、L363、N406 进行饱和突变后，获得产量明显高于对照的突变体。通过测序确定突变体为 G206R、P272F、V276C、V283I、E340S、E340G，产量分别较对照提高 12.5 %、18.2 %、14.8 %、4.5 %、27.6 %、17.0 %。最高产量 77.9 g·L^{-1}，摩尔转化率为 49.9 %。结果如图 11 所示。

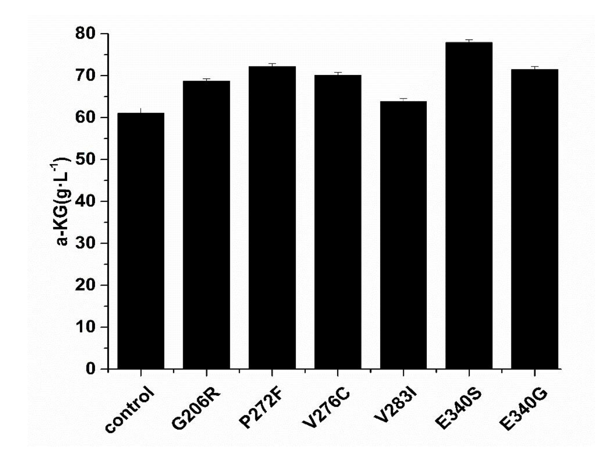


图 11 定点突变正向结果突变体

Fig. 11 Positive result of site-directed mutation

将以上单点突变结果进行组合突变，复合突变体中 P272L/V276C、V276C/V283I、V276C/E340S、V276C/E340G 、 P272L/V283I 、 P272L/E340S 、P272L/E340G、V283I/E340S、P272L/V276C/V283I、P272L/V276C/E340G 、 V276C/V283I/E340G 、P272L/V283I/E340S 、 272L/V283I/E340G 、P272L/V276C/V283I/E340S 、G206R/P272L/V283I/E340G 、G206R/P272L/V276C/V283I/E340S 产量高于对照菌株，结果如图 12 所示。产物合成量分别较对照菌株提高了 27.3 %、28.5 %、42.2 %、25.8 %、5.4 %、23.7 %、22.1 %、16.5 %、16.1 %、28.6 %、34.7 %、35.1 %、30.3 %、53.6 %、49.2 %、66.3 %。其中，突变体 G206R/P272L/V276C/V283I/E340S 的α-KG 产量最高，达 100.9 g·L^{-1}，摩尔转化率为 64.7 %。将此突变株命名为 *E.coli* BL21-pET-20b(+)-*pm1*152。

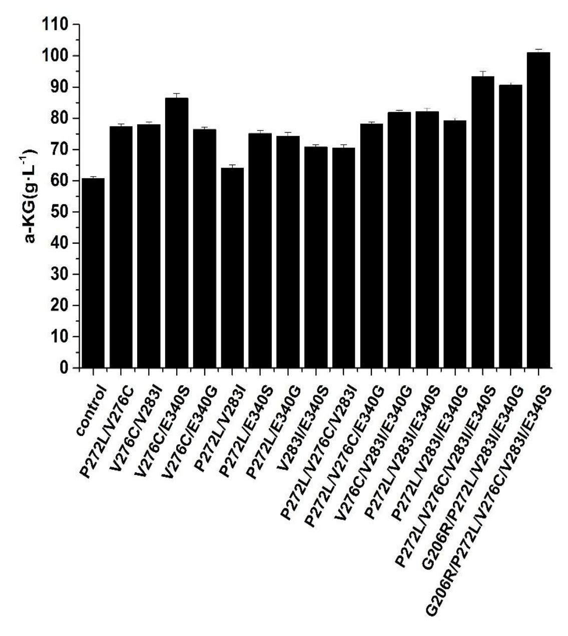


图 12 复合突变正向结果

Fig.12 Positive result of multi-site compound mutation

2.5 L-氨基酸脱氨酶改造后性质验证

将突变株 *E.coli* BL21-pET-20b(+)-*pm1*152 以最适条件发酵，获得全细胞催化剂。分别对全细胞转化过程的温度、pH 和细胞量进行摇瓶优化，验证分子改造后酶的性质。结果如图 13 所示，最适温度、pH 和细胞量与改造前相比没有变化。说明此次突变并未改变酶的性质。

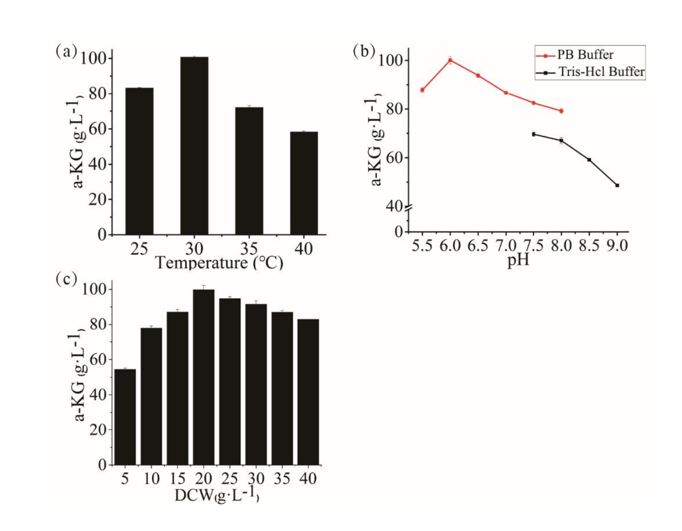


图 13 突变后催化条件对α-酮戊二酸的影响

(a)：温度对催化合成α-酮戊二酸的影响 (b)：pH 对催化合成α-酮戊二酸的影响 (c)：细胞量对催化合成α-酮戊二酸的影响

Fig. 13 Effects of catalytic conditions on alpha-ketoglutarate production after mutation

(a): Effects of temperature on alpha-ketoglutarate production (b): Effects of pH on alpha-ketoglutarate production (c): Effects of DCW on alpha-ketoglutarate production

3. 结论

本研究经过对重组大肠杆菌全细胞催化条件进行优化。确定其最适条件为：种龄 10 h，诱导剂 IPTG 终浓度为 0.06 mmol·L^{-1}，菌体 OD_{600} 值为 3.0 左右时添加诱导剂，诱导温度为 20℃，诱导时间为 12 h。全细胞转化反应最适条件为：反应温度为 30 ℃，反应 pH 为 6.0，反应时间 60 h，反应细胞浓度(DCW)为 20 g·L^{-1}。在此条件下，200 g·L^{-1} 底物 MSG 全细胞转化合成产物α-KG 值为 61.8 g·L^{-1}，摩尔转化率为 39.6 %。此外，通过定点饱和突变及多点复合突变获得突变体 *E.coli* BL21-pET-20b(+)-*pm1*152，产量提高至 100.9 g·L^{-1}，提高了 66.3 %，此时摩尔转化率为 64.7 %。且突变并未改变酶的性质。本研究为α-KG 的工业化生产奠定了基础。

参考文献

[1] Matzi V, Lindenmann J, Muench A, et al. The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. European Journal of Cardio-thoracic Surgery, 2007, 32(5): 776-782.

[2] Sauer M, Porro D, Mattanovich D, et al. Microbial production of organic acids: expanding the markets. Trends in Biotechnology, 2008, 26(2): 100-108.

[3] Jinap, S, Hajeb, P. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. Appetite, 2010, 55(1): 1-10.

[4] Stottmeister U, Aurich A, Wilde H, et al. White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005, 32(11-12): 651-664.

[5] 牛盼清, 张震宇, 刘立明. 酶法转化L-谷氨酸生产α-酮戊二酸. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1318-1322.
Niu P Q, Zhang Z Y, Liu L M. Enzymatic production of α-ketoglutaric acid by L-glutamate oxidase from L-glutamic acid. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(8): 1318-1322.

[6] Liu L, Hossain G S, Shin H D, et al. One-step production of alpha-ketoglutaric acid from glutamic acid with an engineered L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*. Journal of Biotechnology, 2013, 164(1): 97-104.

[7] Hossain G S, Li J, Shin H D, et al. Improved production of alpha-ketoglutaric acid (alpha-KG) by a *Bacillus subtilis* whole-cell biocatalyst via engineering of L-amino acid deaminase and deletion of the alpha-KG utilization pathway. Journal of Biotechnology, 2014, 187(187): 71-77.

[8] Hou Y, Hossain G S, Li J, et al. Production of phenylpyruvic acid from L-phenylalanine using an L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*: comparison of enzymatic and whole-cell biotransformation approaches. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(20): 8391-8402.

[9] Li R, Sakir H G, Li J, et al. Rational molecular engineering ofl-amino acid deaminase for production of α-ketoisovaleric acid froml-valine by *Escherichia coli*. Rsc Advances, 2017, 7(11): 6615-6621.

[10] Song Y, Li J, Shin H D, et al. One-step biosynthesis of alpha-ketoisocaproate from L-leucine by an *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing an L-amino acid deaminase from *Proteus vulgaris*. Scientific Reports, 2015, 5: 12614.

[11] Carvalho C C C R D. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. Biotechnology Advances, 2011, 29(1): 75-83.

[12] Baek J O, Seo J W, Kwon O, et al. Expression and characterization of a second L-amino acid deaminase isolated from *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*. Journal of Basic Microbiology, 2011, 51(2): 129-135.

[13] Faust A, Niefind K W, Schomburg D. The structure of a bacterial L-amino acid oxidase from Rhodococcus opacus gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation. Journal of Molecular Biology, 2007, 367(1): 234-248.

[14] Pelmont J, Arlaud G, Rossat A M. L-aminoacide oxydases des enveloppes de *Proteus mirabilis* : propriétés générales. Biochimie, 1972, 54(10): 1359-1374.

[15] Hossain GS, Li J, Shin HD, et al. Bioconversion of l-glutamic acid to α-ketoglutaric acid by an immobilized whole-cell biocatalyst expressing L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*. Journal of Biotechnology, 2014, 169(Complete): 112-120.

[16] Motta P, Molla G, Pollegioni L, et al. Structure-function relationships in L-amino acid deaminase, a flavoprotein belonging to a novel class of biotechnologically relevant enzymes. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(20): 10457-10475.

[17] 宋阳. L-氨基酸脱氨酶分子改造及生物合成α-酮异己酸. 无锡: 江南大学, 2018.
Song Y. Molecular modification of L-amino acid deaminase and biosynthesis of α-ketoisocaproate. Wuxi: Jiangnan University, 2018.

Molecular Modification of L-amino Acid Deaminase and Optimization of α-ketoglutaric Acid Production by Whole-cell Biocatalysis *

WANG Yue LI Jiang-hua DU Guo-cheng LIU Long**

(Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology Ministry of Education Jiangnan University Wuxi 214122, China)

Abstract Alpha-ketoglutaric acid (α-KG), which is a keto acid product deaminated by glutamic acid, is widely used in food, medicine, fine chemicals and other fields as an important organic acid. To improve the yeild and the efficiency of biotransformation for the synthesis of α-ketoglutaric acid. First, by optimizing the conditions of whole-cell biocatalyst preparation and whole-cell biocatalysis conditions. Optimization conditions include the temperature, pH, inducer concentration, induction time in the whole-cell biocatalyst preparation process and the temperature, pH, biocatalyst concentration, biocatalytic time in the whole-cell biocatalysis process. Determine the optimal conditions of each item by detecting the amount of product α-KG. After the conditions were optimized, the maximum yield was increased by 54.9 % and the molar conversion was 39.6 %. Secondly, the directed evolution of L-amino acid deaminase by site-directed mutagenesis increased its catalytic ability. Through multiple mutations, screening, the yield of α-ketoglutaric acid biocatalytic synthesized by monosodium glutamate with optimal mutant *E.coli* BL21-pET-20b (+)-*pm1*152 was 100.9 g·L^{-1}, and the molar conversion rate was 64.7 %, an increase of 66.3% compared to the control strain. The maximal yield and molar conversion of L-glutamic acid to α-KG was reached under the following optimal conditions: 20 g·L^{-1} whole-cell biocatalyst, 30 ℃, pH 6.0, and 60-h biocatalysis, strain: *E.coli* BL21-pET-20b (+)-*pm1*152. The results showed that the conditional optimization and saturation mutation could effectively increase the whole-cell biocatalyst of recombinant *E. coli* to synthesize α-ketoglutaric acid.

Key words L-amino acid deaminase condition optimization site-saturation mutagenesis whole-cell biocatalyst

---

* Received date:
National Natural Science Foundation Excellent Youth Fund (31622001), Jiangsu Province Key Research and Development Program - Social Development (BE2016638)
** Corresponding author: Liu Long, E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn